



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**La Sobreexpresión de los Genes Id es un Marcador de
Progresión del Cáncer Cervicouterino**

Tesis que presenta

Jacqueline Juárez Cepeda

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., Noviembre de 2005.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 014 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de noviembre del año 2005, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidente	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Secretario	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Jacqueline Juárez Cepeda

sobre la Tesis intitulada:

La Sobreexpresión de los Genes Id es un Marcador de Progresión del Cáncer Cervicouterino

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Dr. Rubén Hipólito López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes noviembre de 2005.


Dr. Marcial Bonilla Márquez
Secretario Académico




Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**La sobreexpresión de los genes Id es un marcador de progresión del cancer cervicouterino**” fue elaborada por **Jacqueline Juárez Cepeda** y aprobada el **21 de octubre de 2005** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
(Codirector de la tesis)

Dr. Rubén López Revilla
(Codirector de la tesis)

Dra. Irene Castaño Navarro
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección codirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo y el Dr. Rubén López Revilla.

El trabajo fue financiado parcialmente con fondos de CONAFOR otorgados al Dr. Luis Antonio Salazar Olivo (CONAFOR-2004-CO4-65) y del Fondo Mixto CONACYT-San Luis Potosí (FMSLP4441) otorgados al Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del mismo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 181969) y una beca complementaria para la escritura de la tesis del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

A MIS PADRES: JESÚS Y VICTORIA

A MI HERMANA: NANCY

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Antonio Salazar Olivo por guiarme en el camino de la investigación, por su tiempo y paciencia

Al Dr. Rubén López Revilla por hacerme participe de sus conocimientos

A la M.C. Rebeca Mejía Elizondo por su amistad, por su aportación técnica y por el tiempo dedicado en la realización de este trabajo

Al Médico Ginecólogo. Julio Ortiz Valdez de la Clínica de Displasias de la Secretaría de Salud por las muestras proporcionadas para la realización de este trabajo

Al Médico Citólogo. Ma. de Lourdes Martínez de Blanco por las muestras proporcionadas y la asesoría prestada para la realización de este trabajo

Al Médico Cirujano. Sara Fonseca Castañol por las facilidades otorgadas en la obtención de muestras

Al Dr. Alejandro García Carrancá del Instituto Nacional de Cancerología en México por las líneas celulares proporcionadas

A la M.C. Mireya Liliana Herrera Herrera y a la M.C. Claudia Olivia Silva Ortega por su amistad, su disposición y asesoría prestada

A la I.A.Z. Cytllalic Rangel Del Camino por su valiosa ayuda en la realización de esta tesis

A la Biol. Mireya Sánchez Garza por su apoyo técnico

A la Dra. Leticia Santos Martínez y la M.C. Erika Nahomy Marino Marmolejo por las muestras proporcionadas

Al Dr. Alejandro De las Peñas Nava y la Dra. Irene Castaño Navarro por la revisión de este trabajo

A mis Compañeros de Laboratorio por el animo brindado

A mis Amigos por orientarme y ayudarme a ver con optimismo las situaciones difíciles

ÍNDICE

Hoja de aprobación de la tesis	2
Créditos institucionales	3
Dedicatorias	4
Agradecimientos	5
Lista de tablas	7
Lista de figuras	8
Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
Materiales y Métodos	17
Resultados	21
Discusión	24
Referencias	27
Tablas	35
Pies de figuras	37
Figuras	40

LISTA DE TABLAS

- | | |
|---|----|
| 1. Marcadores moleculares asociados al CaCu | 35 |
| 2. Sobreexpresión de los genes Id en cánceres humanos | 36 |

LISTA DE FIGURAS

1. Histología del epitelio cervicouterino	40
2. Ciclo de replicación del virus del papiloma humano	41
3. Progresión del CaCu	42
4. Efectos de los factores Id sobre la transcripción	43
5. Cinética de amplificación de los mRNAs para β -actina, Id1, Id2 e Id3 en biopsias de cérvix normal o con LSIL y en células HeLa	44
6. Transcritos de Id1, Id2 e Id3 en biopsias de cérvix normal y en las líneas celulares HeLa y SiHa derivadas de cáncer cervicouterino	45
7. Transcritos de Id1, Id2 e Id3 en biopsias de cérvix normal, con LSIL o con HSIL	46
8. Cultivos primarios de queratinocitos derivados de biopsias del cérvix con LSIL	47
9. Transcritos de Id1, Id2 e Id3 en cérvix normal o con LSIL y en cultivos primarios derivados de biopsias con LSIL	48
10. Expresión de los genes Id1, Id2, Id3 y β -actina en células 3T3-J, tratadas y sin tratar con mitomicina-C	49

RESUMEN

Los genes Id codifican factores de transcripción que actúan como inhibidores de la diferenciación y promueven la proliferación celular, y su sobreexpresión se ha documentado en diversos tipos de cáncer. Id1 ha sido considerado como un marcador molecular de cáncer cervicouterino (CaCu) dado que su sobreexpresión se asocia a la disminución en la esperanza de vida de pacientes con CaCu invasor. Se desconocen los niveles de expresión de los genes Id en lesiones precursoras de CaCu. Para explorar su utilidad como marcadores de progresión en CaCu, analizamos por RT-PCR semicuantitativa la transcripción de los genes Id1, Id2 e Id3 en biopsias de lesiones cervicales intraepiteliales escamosas de bajo (LSIL) y alto grado (HSIL), precursoras de CaCu. Las HSIL sobreexpresaron marcadamente los genes Id1 (363%), Id2 (249%) e Id3 (319%) respecto al cérvix normal. Las líneas celulares HeLa y SiHa, derivadas de CaCu y usadas como control presentaron también altos niveles de transcripción para estos genes. En LSIL sólo el gen Id3 tuvo una sobreexpresión moderada (202%) respecto al tejido normal. El origen epitelial de la sobreexpresión de los genes Id se confirmó en cultivos primarios de queratinocitos cervicales derivados de LSIL. Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de los genes Id efectivamente es un marcador de progresión desde las etapas tempranas del CaCu.

Palabras claves: cáncer cervicouterino, genes Id, RT-PCR semicuantitativa

ABSTRACT

Id genes encode transcription factors that inhibit cell differentiation and promote cell growth and their overexpression has been shown in various types of cancer. Id1 has been considered a molecular marker of cervical cancer (CC) because its overexpression is associated with a decrease of life expectancy in patients with invasive CC. The expression levels of Id genes in preneoplastic cervical lesions are unknown. To explore their use as CC progression markers, we analyzed the transcription of Id1, Id2 and Id3 in squamous intraepithelial lesions of low (LSIL) and high (HSIL) grade, precursors of CC, by semiquantitative RT-PCR. The HSIL strongly overexpressed the Id1 (363%), Id2 (249%) and Id3 (319%) genes compared with normal cervix. HeLa and SiHa cell lines, derived from invasive CC also showed high levels of expression for these genes. In LSIL only Id3 showed a moderate overexpression (202%) compared with normal tissue. The epithelial origin Id genes overexpression was confirmed in primary cultures of cervical keratinocytes derived from LSIL. Our results suggest that the Id genes overexpression can indeed used as CC progression marker.

Key words: cervical cancer, Id genes, semiquantitative RT-PCR

INTRODUCCIÓN

Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo cáncer más frecuente en mujeres en todo el mundo, con más de 500,000 nuevos casos diagnosticados cada año, y el primero en los países en desarrollo (Franco y cols, 2001). En México el CaCu es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (INEGI, 2001) y su prevalencia, de alrededor de 44.4 casos por cada 100,000 mujeres (Giuliano y cols, 2001), tiende a incrementarse en grupos de población cada vez más jóvenes (Lazcano-Ponce y cols, 1996).

Desarrollo del CaCu

La infección del epitelio cervical por papilomavirus humanos (VPH) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de CaCu (Richart y Wright, 1991). La primera evidencia de la relación entre el CaCu y la infección por VPH se publicó en 1977 (zur Hausen, 1977). Estudios adicionales han concluido que los tipos de VPH denominados de alto riesgo se asocian al 99.7 % de los casos de CaCu en todo el mundo (Walboomers y cols, 1999).

Aunque la historia natural de la infección por VPH no se conoce totalmente, se piensa que el virus ingresa al epitelio cervicouterino (Figura 1) a través de microlesiones e infecta a las células basales del epitelio, en donde replica su DNA. La síntesis de la cápside viral, por otro lado, se realiza en células suprabasales parcialmente diferenciadas. El ensamblaje de nuevas partículas virales y la lisis celular resultan en la producción de nuevos virus, sin mayor daño para la estructura tisular (Figura 2). Por el contrario, la transformación neoplásica debida a la integración de los oncogenes virales E6 y E7 al genoma celular y su consecuente expresión, conducen a la progresión del ciclo celular y postergan o cancelan la diferenciación terminal. El estado hiperproliferativo de las células que expresan los oncogenes virales da lugar a focos de crecimiento celular fuera del estrato basal del epitelio (neoplasia) y al incremento del riesgo de cáncer (Figura 3) (Burd, 2003).

El CaCu es precedido por lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado (*Low grade Squamous Intraepithelial Lesions*, LSIL, y *High grade Squamous Intraepithelial Lesions*, HSIL, respectivamente) según la clasificación de Bethesda (Solomon y cols, 2002). El término alto grado incluye las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) moderadas (NIC 2) y severas (NIC 3) de la clasificación de Richart, y el término bajo grado equivale a las neoplasias leves (NIC 1) de la misma clasificación (IARC, 1996). En México se diagnostican anualmente 123.81 casos de displasias leves y moderadas y 21.54 casos de displasias severas y CaCu in situ por cada 100,000 mujeres mayores de 14 años (Secretaría de Salud, 2004).

Métodos de Diagnóstico

Durante la progresión de las lesiones precursoras del CaCu el único signo de la enfermedad es la presencia de células anormales desprendidas del epitelio del cérvix, por lo que la prueba de Papanicolaou (Pap) se utiliza ampliamente para el diagnóstico (Gustafsson y cols, 1997). Pese a su éxito, esta prueba no puede alcanzar una alta especificidad sin reducir su sensibilidad (Fahey, 1995). La principal limitación de la prueba son los falsos negativos, que pueden corresponder a cerca de la mitad de los frotis analizados. De éstos, alrededor de un tercio son atribuibles a errores de interpretación y dos tercios a la toma de muestra y preparación de la placa (McCrorry y cols, 1999).

Por otro lado, las pruebas de captura de híbridos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que están en curso de aplicarse para la detección y tipificación del VPH, podrían dar resultados más precisos respecto a la infección por VPH, sobre todo en resultados citológicos ambiguos (Schiffman y cols, 2002). Sin embargo, la mera detección del VPH presenta así mismo limitaciones diagnósticas porque no todas las infecciones por VPH darán lugar a cáncer, aun aquellas causadas por los tipos virales de alto riesgo (Ostör, 1993). Actualmente el VPH se considera como un factor necesario pero no suficiente para el desarrollo de CaCu (Unger y cols, 2004), puesto que las lesiones de bajo grado tienen más probabilidad de remitir que de progresar a CaCu invasor (Ostör, 1993; Baldauf y

Ritter, 1998; Holowaty y cols, 1999). Así mismo, se ha reconocido que la remisión ocurre en un número variable pero significativo de lesiones de alto grado (Ostör, 1993). La tasa de progresión de LSIL a carcinoma invasor se encuentra entre el 6% y el 34% (Ostör, 1993) y la tasa de remisión es aproximadamente del 70% (Ostör, 1993; Baldauf y Ritter, 1998), en tanto que las HSIL muestran una tasa de remisión del 32% (Ostör, 1993) y una progresión a carcinoma invasor de hasta el 70%. Por ello la búsqueda de marcadores moleculares con valor pronóstico que permitan la detección temprana de displasias cervicales con alto potencial cancerígeno es un activo campo de investigación (Sopov y cols, 2004; Unger y cols, 2004).

Marcadores Moleculares

Se ha estudiado una extensa variedad de marcadores moleculares asociados al CaCu y a sus lesiones precursoras (Tabla 1). Así, se han descrito altos niveles séricos del receptor para el factor de crecimiento epidérmico en pacientes con HSIL y CaCu invasor (Oh y cols, 2000) y de angiogenina y factor de crecimiento similar a insulina tipo II en CaCu invasor (Bodner-Adler y cols, 2001; Mathur y cols, 2003). Algunas proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular como p16INK4A, que bloquea la actividad del complejo CDK-ciclina D y activa la proteína del retinoblastoma, se sobreexpresan en infecciones por VPH y en displasias (Klaes y cols, 2001; Sano y cols, 2002; Saqi y cols, 2002). Igualmente, la actividad de la telomerasa, que mantiene la longitud de los telómeros y regula así funciones celulares importantes como la mitosis, la estabilidad cromosómica y el tiempo de vida de linajes celulares, se encuentra incrementada en LSIL y en carcinomas (Jarboe y cols, 2002; Sen y cols, 2002). Ciertos cambios en la estructura de la cromatina también se han sugerido como marcadores de CaCu. Las regiones reguladoras de los genes p16 y de E-cadherina muestran hipermetilación en CaCu, mientras que la hipometilación se incrementa en la región larga de control y en la región promotora de E6 del VPH conforme aumenta la severidad de las lesiones (Virmani y cols, 2001; Badal y cols, 2003; Chen y cols, 2003).

Proteínas Id

Recientemente se ha propuesto que las proteínas Id podrían ser utilizadas como marcadores de la progresión de diversos tipos de cáncer. La familia de proteínas Id (*Inhibitor of differentiation/DNA binding*) consta de cuatro miembros, Id1, Id2, Id3 e Id4, los cuales actúan como factores de transcripción del tipo *helix-loop-helix* (HLH). Las proteínas Id carecen del dominio de unión a DNA y forman heterodímeros con factores de transcripción bHLH. Estos heterodímeros son incapaces de unirse al DNA, así que las proteínas Id actúan como inhibidores de la expresión génica (Figura 4). Las proteínas Id forman heterodímeros con las proteínas E (E12, E47, E2-2, HEB), con pRB y proteínas de la familia homeobox (PAX-2, PAX-5 y PAX-8), entre otras. La expresión de las proteínas Id parece estar mediada por vías de señalización acopladas a señales extracelulares. Los niveles intracelulares de las proteínas Id son regulados a través de la degradación vía ubiquitina-proteasoma. Como otros reguladores positivos del ciclo celular, las proteínas Id también son reguladas por su localización subcelular ya que no poseen señales de localización nuclear (Norton, 2000).

La sobreexpresión de Id1 se ha documentado en cánceres de tiroides (Kebebew y cols, 2000) y endometrio (Takai y cols, 2001), carcinomas de células escamosas del esófago (Hu y cols, 2001) y la nasofaringe (Wang y cols, 2002), así como en melanomas (Polsky y cols, 2001). Id1, Id2 e Id3 son sobreexpresados también en cáncer de páncreas (Maruyama y cols, 1999), cáncer colorrectal (Wilson y cols, 2001), tumores astrocíticos (Vandeputte y cols, 2002) y carcinomas de células escamosas del cuello y la cabeza (Langlands y cols, 2000) (Tabla 2).

Las proteínas Id1 e Id2 son sobreexpresadas en células agresivas de cáncer de próstata, mientras que en próstata normal o con hiperplasia benigna muestran una expresión débil o nula (Ouyang y cols, 2002a; Coppe y cols, 2004). La expresión constitutiva de Id1, y en menor medida la de Id2, convierte a las células de cáncer de próstata LNCaP no agresivas en células hiperproliferativas, e incrementa su secreción de metaloproteinasas y su invasividad (Coppe y cols, 2004). La sobreexpresión de Id1 en células de cáncer de próstata también promueve la angiogénesis a través del factor de crecimiento vascular endotelial

(Ling y cols, 2005), induce la inactivación de p16(INK4a)/pRB (Ouyang y cols, 2002b), activa la vía de señalización MAPK (Ling y cols, 2002), e induce efectos antiapoptóticos mediante la vía de señalización NF-kappaB (Ling y cols, 2003).

Diversos estudios han abordado el papel de la proteína Id1 en el cáncer de mama, tanto en líneas celulares como en biopsias. La sobreexpresión de Id1 se ha observado en células de cáncer de mama no diferenciadas de fenotipo agresivo y metastásico en cultivo y en biopsias de carcinomas invasivos infiltrantes, pero no en carcinomas in situ (Desprez y cols, 1998; Lin y cols, 2000). Los pacientes con expresión de Id1 moderada a fuerte tienen menor esperanza de vida que los que expresan este gen poco o nada (Schoppmann y cols, 2003). Así mismo, la expresión ectópica de Id1 en líneas celulares de cáncer de mama no tumorigénicas como SCp2 y T47D impide su diferenciación terminal y las vuelve hiperproliferativas e invasivas (Desprez y cols, 1998; Lin y cols, 2000).

A diferencia de Id1, la sobreexpresión de Id2 en células epiteliales mamarias induce quiescencia y diferenciación (Itahana y cols, 2003). Id2 generalmente se sobreexpresa en tumores humanos altamente diferenciados, principalmente carcinomas in situ, y su expresión es mínima en tumores de células agresivas y metastásicas (Itahana y cols, 2003).

Recientemente se mostró que la proteína Id1 se sobreexpresa en aproximadamente el 70% de los casos de cáncer de ovario y correlaciona con una pobre esperanza de vida de los pacientes (Schindl y cols, 2003). En este tipo de cáncer Id1 induce un estado hiperproliferativo que parece estar mediado por la sobreexpresión del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (Zhang y cols, 2004). Un efecto que se ha observado con la sobreexpresión de Id1 y la subexpresión de otros genes ha sido el incremento en la actividad de desacetilasas de histonas. La tricostatina A, inhibidor de desacetilasas de histonas, bloquea la proliferación de las células A2780 de cáncer ovárico al tiempo que induce la sobreexpresión de p21, un inhibidor de ciclinas dependientes de cinasas, y la subexpresión de Id1 (Strait y cols, 2002).

Hasta ahora el papel que las proteínas Id podrían jugar en el desarrollo del CaCu ha sido escasamente explorado. Un estudio inmunohistoquímico mostró que

pacientes de CaCu invasor con expresión moderada a fuerte de Id1 tienen menor esperanza de vida y menor tiempo de supervivencia libre de enfermedad que pacientes cuya expresión de Id1 es baja o nula (Schindl y cols, 2001). El mismo trabajo sugiere que la expresión de Id2 e Id3 no parece tener valor pronóstico para el desarrollo de CaCu puesto que sólo un escaso número de las muestras analizadas revelaron la expresión de estos genes. Se desconocen por lo tanto los niveles de expresión de los genes Id en las lesiones precursoras de CaCu. El objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles de expresión de los genes Id1, Id2 e Id3 en muestras de epitelio cervicouterino humano normal y con LSIL o HSIL para ser usado como marcador molecular. Mediante análisis semicuantitativos de transcripción reversa y PCR (RT-PCR) encontramos que la expresión de los genes Id1, Id2 e Id3 aumenta en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) precursoras de CaCu. Los genes se sobreexpresan también en las líneas celulares HeLa y SiHa derivadas de CaCu y en cultivos primarios de queratinocitos derivados de LSIL. Nuestros resultados indican que los genes Id son marcadores de utilidad pronóstica y proponen estudios adicionales sobre la desregulación de estos factores de transcripción a lo largo de la historia natural del CaCu.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las Biopsias

Las biopsias de epitelio cervicouterino se obtuvieron de mujeres con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado, a quienes se les practicaron previamente la prueba de Papanicolaou y estudios histopatológicos, y otorgaron su consentimiento informado. Las biopsias fueron proporcionadas por el Médico Ginecólogo Julio Ortiz Valdez de la Clínica de Displasias de la Secretaría de Salud y por el Médico Citólogo Ma. de Lourdes Martínez de Blanco del Centro Diagnóstico (consultorio particular). Las biopsias, tomadas de la unión escamocolumnar del cérvix, fueron de espesor completo, es decir, incluyeron epitelio y tejido conectivo. Se tomaron ocho biopsias normales, 12 biopsias con LSIL y 13 con HSIL para la extracción de RNA, y cuatro biopsias con LSIL para el cultivo celular. Las biopsias destinadas a la extracción de RNA se colocaron en nitrógeno líquido, mientras que las destinadas al cultivo celular se colectaron en tubos estériles que contenían solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) adicionada con seroalbúmina bovina al 0.1% y una mezcla de antibióticos (10 µg/ml de anfotericina, 100 µg/ml de sulfato de gentamicina y 10 µg/ml de fluconazol). La anfotericina, el sulfato de gentamicina y la seroalbúmina bovina fueron de Sigma (St. Louis MO, E.U.A.) y el fluconazol de Pfizer (Amboise, Cedex-Francia).

Cultivos Celulares

Las células HeLa y SiHa, generosamente proporcionadas por el Dr. Alejandro García Carrancá (Instituto Nacional de Cancerología, México) se cultivaron con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero de ternera (GIBCO BRL; Grand Island, NY, E.U.A.). Los cultivos primarios de queratinocitos cervicales se establecieron a partir de biopsias disgregadas con tripsina al 0.25% (GIBCO BRL), en cocultivo con células alimentadoras 3T3-J tratadas con mitomicina-C (Sigma) (Rheinwald y Green, 1975), empleando como medio de cultivo una mezcla de DMEM/F12 (3:1 v/v),

adicionada con 10% de suero fetal de bovino (GIBCO), 2.5 µg/ml de anfotericina, 25 µg/ml de sulfato de gentamicina, 2.5 µg/ml de fluconazol, toxina de cólera 10^{-10} M, 5 µg/ml de hidrocortisona, triyodotironina 2×10^{-9} M, 2.5 µg/ml de transferrina y 10 µg/ml de insulina (Stanley, 2002). El medio de cultivo incluyó, a partir del tercer día, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico. Todos los suplementos del medio de cultivo, excepto el suero fueron de Sigma. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y tres cambios de medio por semana. El crecimiento celular fue monitoreado diariamente.

Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo mediante el método de isotiocianato de guanidina empleando Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.), se cuantificó espectrofotométricamente y su integridad se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio.

RT-PCR semicuantitativa

La transcripción reversa (RT) se realizó empleando 2 µg de RNA total en un volumen de reacción de 20 µl. La primera etapa de la reacción consistió en una incubación a 70°C durante 10 min del RNA y oligo dT₁₅ a concentración final de 0.025 µg/µl, con el fin de permitir la unión del oligo dT₁₅ al RNA y deshacer las posibles estructuras secundarias. Toda el agua empleada se trató con dietilpirocarbonato (DEPC). A continuación se agregó amortiguador que contiene Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM pH 8.3; además se adicionaron dNTPs 0.5 mM, 25 U de RNasin (inhibidor de RNasas) y 10 U de transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina; la mezcla se mantuvo a 42°C durante 90 min. Finalmente, la mezcla se incubó a 70°C durante 5 min para inactivar la transcriptasa reversa. Todos los reactivos utilizados para la RT fueron de Promega (Madison, WI, E.U.A.).

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se obtuvieron de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Los

oligonucleótidos para β -actina (PMC133998P8) fueron: oligonucleótido sentido 5'-GCATCCTCACCCCTGAAGTACC-3' y oligonucleótido antisentido 5'-GCTCGTAGCTCTTCTCCAGGG-3' que corresponden a los nucleótidos 261-281 y 777-797, respectivamente, de la secuencia de cDNA de β -actina y generan un producto de amplificación de 539 pb. Los oligonucleótidos para Id1 (PMC22262P1) fueron: oligonucleótido sentido 5'-CACCCCTCAACGGCGAGATC-3' y oligonucleótido antisentido 5'-CCACAGAGCACGTAATTCCTC-3' que corresponden a los nucleótidos 488-507 y 614-634, respectivamente, de la secuencia de cDNA de Id1 y generan un producto de amplificación de 149 pb. Los oligonucleótidos para Id2 fueron: oligonucleótido sentido 5'-GAAAAACAGCCTGTCCGACCA-3' y oligonucleótido antisentido 5'-CCAGGGCGATCTGCAGGT-3' que corresponden a los nucleótidos 215-236 y 404-421, respectivamente, de la secuencia de cDNA de Id2 y generan un producto de amplificación 209 pb. Los oligonucleótidos para Id3 se diseñaron utilizando el oligonucleótido sentido 5'-GCCGTGTCCTGACACCTC-3' (G42964) y el oligonucleótido antisentido 5'-TAGAGTTCATAAATCAGGGCAACAG-3' (RH70878) que corresponden a los nucleótidos 732-749 y 1092-1116, respectivamente, de la secuencia de cDNA de Id3 y generan un producto de amplificación de 387 pb. Los oligonucleótidos se obtuvieron de Invitrogen y su estabilidad y apareamiento se verificaron con el programa Basilisk II, A 68k Macintosh emulator (<http://www.students.uni-mainz.de/bauec002/B2Main.html>).

Las PCR se realizaron en mezclas de reacción de 25 μ l con 5 ng de cDNA, dNTPs 200 μ M, $MgCl_2$ 1.5 mM, una unidad de Taq DNA polimerasa y 12.5 pmoles de oligonucleótidos, amortiguador 1 \times (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, Triton[®] X-100 0.1%, pH 9.0) en agua-DEPC. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 1 min a 72°C entre 20-24 ciclos y extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes de los geles se obtuvieron con un documentador ChemicDoc EQ (Bio-Rad; Hercules, CA, E.U.A.) y los pixeles de las bandas se cuantificaron con ayuda del programa Quantity One (Bio-Rad; Hercules,

CA, E.U.A.). Los niveles de RNA normalizados se expresaron como la razón de la intensidad de la señal en pixeles de cada gen con respecto a la señal del gen control (β -actina) y se expresaron como porcentaje.

Análisis Estadístico

Los niveles de los transcritos se midieron en pixeles y se expresaron como la razón de la intensidad de cada gen con respecto a la intensidad de los transcritos del gen control β -actina. Con la suma de los cocientes obtenidos del mismo tipo de condición se calcularon las medias y desviaciones estándar de cada condición analizada. La media y la desviación estándar de cada condición se expresaron como porcentaje y se graficaron. El análisis estadístico de ANOVA permitió comparar las distintas condiciones con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

Establecimiento de las condiciones para el análisis semicuantitativo de la expresión de los genes Id en cérvix humano

Para estimar posibles diferencias entre la expresión de los genes Id del cérvix humano normal respecto a HSIL y LSIL realizamos análisis de RT-PCR semicuantitativa múltiplex para los genes Id1, Id2 e Id3, usando el gen de β -actina como control. Este método se basa en la amplificación simultánea de los cDNAs derivados de los transcritos de los genes problema y del gen control y requiere que la amplificación no alcance la saturación. Por ello, determinar la fase exponencial de la reacción de amplificación es el paso crítico de esta técnica.

Las cinéticas de amplificación de los transcritos de genes Id se determinaron usando RNA total de una biopsia de cérvix normal y una con LSIL, así como de un cultivo de células HeLa como control positivo. La figura 5 muestra las cinéticas de amplificación de los transcritos para los tres genes Id y el gen de β -actina. Al lado de cada cinética se muestran imágenes representativas de la electroforesis de los productos de amplificación a lo largo de ciclos de reacción sucesivos. La fase exponencial para Id1 se observó entre los ciclos 20 y 30 en las muestras de cérvix normal, entre los ciclos 20 y 28 en LSIL y entre los ciclos 18 y 27 en las células HeLa. La amplificación del cDNA de Id2 fue exponencial entre los ciclos 21 y 28 en las tres muestras analizadas, aunque en el caso de cérvix normal se observó desde el ciclo 21 y se prolongó hasta el ciclo 32. La amplificación del cDNA de Id3 en muestras de cérvix normal se observó desde el ciclo 22 y se prolongó hasta el ciclo 30, mientras que en LSIL y células HeLa la fase exponencial abarcó los ciclos 20 a 28. La fase exponencial para β -actina se observó entre los ciclos 17 y 24 en las tres muestras analizadas y en las muestras LSIL se prolongó hasta el ciclo 26. Por lo tanto, el número de ciclos de amplificación empleado en los análisis de los genes Id fue 23 para Id1 y 24 para Id2 e Id3. En el caso de β -actina, la PCR abarcó 20 ciclos.

Expresión de los genes Id en líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino

Aunque la expresión de los genes Id se ha documentado en múltiples líneas celulares de distintos linajes (Desprez y cols, 1998; Israel y cols, 1999; Lin y cols, 2000), existen escasos reportes sobre su expresión en líneas celulares de CaCu invasor humano. Para determinar los niveles de transcripción de los genes Id en líneas celulares derivadas de CaCu, analizamos la expresión de estos genes en cultivos de las líneas celulares HeLa y SiHa y la comparamos con la de biopsias de cérvix normal. Los genes Id1, Id2 e Id3 mostraron una marcada sobreexpresión en células HeLa y SiHa en relación a cérvix normal (Figura 6). En células HeLa Id1 se expresó 624%, Id2 326% e Id3 701% respecto al control, en tanto que en células SiHa Id1 se expresó un 366%, Id2 244% e Id3 397%. En general, los genes Id tuvieron menor sobreexpresión en células SiHa que en células HeLa.

Expresión de los genes Id en el cérvix normal o con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo (LSIL) y alto grado (HSIL)

La sobreexpresión de los genes Id1, Id2 e Id3 en líneas celulares derivadas de CaCu abrió la posibilidad de que también pudieran sobreexpresarse en las lesiones precursoras de CaCu. Analizamos la expresión de estos genes en ocho biopsias normales, 12 con LSIL y 13 con HSIL. Los análisis de RT-PCR semicuantitativa mostraron que los genes Id aumentan su expresión conforme progresan las lesiones cervicales. Aunque en LSIL no se observó sobreexpresión de los genes Id1 e Id2, el gen Id3 incrementó su expresión un 202%, estadísticamente significativa, respecto al control normal. Por otro lado, en HSIL los tres genes mostraron una marcada sobreexpresión respecto al control. Id1 se expresó 363%, Id2 249% e Id3 319%. De los tres genes, Id1 mostró los mayores niveles de expresión en HSIL (Figura 7).

Expresión de los genes Id en cultivos primarios de queratinocitos cervicales

El experimento anterior mostró la correlación entre la sobreexpresión de los genes Id1, Id2 e Id3 y la progresión de las lesiones precursoras de CaCu. No obstante, este resultado no estableció si la sobreexpresión corresponde exclusivamente al epitelio cervicouterino o al estroma (tejido conectivo) presente en la biopsia. Para determinar si el epitelio cervicouterino lesionado sobreexpresa los genes Id también analizamos su expresión en cuatro cultivos primarios de queratinocitos cervicales de biopsias de cérvix con LSIL (Figura 8), y la comparamos con la mostrada por las ocho biopsias de cérvix normal y las 12 con LSIL. En cultivos derivados de LSIL no observamos sobreexpresión del gen Id2, pero sí de los genes Id1 e Id3, los cuales incrementaron su expresión en 284% y en 281%, respectivamente, en relación al control (Figura 9). Para evaluar la participación de las células alimentadoras en dicha sobreexpresión, analizamos en ensayos paralelos la expresión en células 3T3-J tratadas o sin tratar con mitomicina-C, y en ninguna de las dos condiciones observamos transcripción de Id1 ni de Id3 (Figura 10).

DISCUSIÓN

Diversos trabajos sugieren que los genes Id pueden actuar como oncogenes, promoviendo la proliferación celular mediante la inactivación de las proteínas supresoras de tumores o la activación de las vías promotoras del crecimiento (Israel, 1999; Norton, 2000). Un estudio inmunohistoquímico reciente mostró que pacientes con CaCu invasor y expresión moderada a fuerte de Id1 tienen menor esperanza de vida que pacientes cuya expresión de Id1 fue baja o nula (Schindl y cols, 2001). No obstante, la búsqueda de reportes sobre la expresión de los genes Id en líneas celulares derivadas de CaCu arrojó escasos resultados. Solo un trabajo reciente señala que las células HeLa expresan el gen Id1 a niveles mínimos (Trausch-Azar y cols, 2004), aunque no presenta evidencias de tal aserto. Éste, por lo demás, es contrario a lo esperado en células con proliferación activa y capacidad de diferenciación terminal restringida (Norton, 2000; Yokota y Mori, 2002).

Nuestros resultados muestran, por el contrario, que los genes Id se sobreexpresan en las líneas celulares HeLa y SiHa, derivadas de CaCu invasor. En ambas líneas los genes Id1 e Id3 se sobreexpresaron marcadamente y a niveles equiparables, aunque con mayor intensidad en HeLa que en SiHa. Id2 también se sobreexpresó en ambas líneas celulares respecto al tejido cervical normal, pero mostró una expresión menor que Id1 e Id3 y de similar intensidad en ambas líneas. Las causas de las diferencias en la intensidad de la expresión de los genes Id1 e Id3 entre las células HeLa y SiHa no fueron explorados en el presente trabajo. Éstas podrían incluir, entre otras, la diferencia en el tipo de VPH causante de la transformación maligna en cada línea (VPH 16 en SiHa y VPH 18 en HeLa), el distinto sitio de inserción de los oncogenes virales en el genoma celular, el número de copias del genoma viral o bien alteraciones en la regulación de los genes Id mismos. La expresión constitutiva de Id en células metastásicas de cáncer mamario depende de la pérdida de un complejo represor integrado por las proteínas SP-1, NF-1, Rb y HDAC-1 (Singh y cols, 2002). Las diferencias de expresión de Id1 en HeLa y SiHa podrían deberse a cambios en la expresión o en la funcionalidad de este complejo represor. Éste podría, así mismo, regular la

expresión de Id3, dada la homología de secuencias entre ambos genes (de Candia, 2004). En todo caso, las diferencias de expresión de Id1 e Id3 entre HeLa y SiHa podrían explicar las diferencias en sensibilidad que estas líneas muestran a agentes que inhiben la proliferación e inducen apoptosis en células de carcinoma cervical, como los retinoides (Oridate y cols, 1995), así como sus diferentes respuestas a tratamientos supresores de tumorigenicidad (Su y Wu, 1996).

Nuestros resultados muestran también sobreexpresión de los genes Id en las lesiones precursoras de CaCu. En HSIL observamos un patrón similar al de células HeLa y SiHa; esto es, marcada sobreexpresión de Id1 e Id3 y sobreexpresión moderada de Id2. En LSIL, en cambio, sólo el gen Id3 mostró una sobreexpresión moderada respecto al tejido normal.

Para verificar el origen epitelial de la sobreexpresión de los genes Id en las lesiones precursoras de CaCu, analizamos su expresión en cultivos primarios de queratinocitos derivados de LSIL. Este análisis confirmó la marcada sobreexpresión de Id3 y la expresión normal de Id2 observadas en el análisis de biopsias de LSIL, pero también que los queratinocitos cultivados sobreexpresaron Id1 a niveles similares a Id3, muy por encima de los niveles de las biopsias. Las diferencias en los niveles de Id1 entre biopsias y cultivos celulares podría ser el resultado del enriquecimiento en esta última muestra de queratinocitos basales con alta capacidad proliferativa. La presencia del factor de crecimiento epidérmico en el medio de cultivo pudo contribuir también a la sobreexpresión de Id1 e Id3, pues se sabe que dicho factor induce la expresión de estos genes (Le Jossic y cols, 1994) a través de la vía de señalización RAS-ERK-MAPK (Goustin y cols, 1986).

Para descartar la posibilidad de contaminación con mRNA de fibroblastos 3T3-J, en ensayos paralelos analizamos la expresión de los genes Id en células 3T3-J, tratadas y sin tratar con mitomicina-C. En dichos análisis no observamos transcripción de Id1 ni de Id3 en las dos condiciones, lo que descarta que la sobreexpresión de Id1 e Id3 observada en los cultivos primarios de queratinocitos pudiera deberse a las células alimentadoras remanentes. Por el contrario, el gen Id2 si se expresó en las células 3T3-J bajo ambas condiciones, lo cual parece

confirmar que Id2 no está directamente relacionado a proliferación, dada la incapacidad de las células mitomicinadas para proliferar.

El presente trabajo extiende el estudio previo de la expresión de Id1 en CaCu (Schindl y cols, 2001), mostrando que este gen se sobreexpresa marcadamente en lesiones precursoras de alto grado. Adicionalmente, nuestro trabajo muestra que Id3, un gen hasta ahora escasamente asociado a la progresión de cáncer, se sobreexpresa tanto en HSIL como LSIL precursoras de CaCu. La discrepancia de nuestros resultados con trabajos previos que no encuentran sobreexpresión de Id3 en CaCu invasivos podría deberse a que Id3 juega un papel activo en los estadios tempranos, pero no en los estadios avanzados del CaCu, como se ha sugerido recientemente para hepatocarcinomas celulares (Damdinsuren y cols, 2005). La prueba experimental de este supuesto demanda el análisis de un número mayor de lesiones precursoras y estadios avanzados de CaCu y su confirmación aumentaría el valor pronóstico de la sobreexpresión de Id3 en lesiones preneoplásicas y neoplásicas de CaCu.

Nuestros resultados parecen confirmar que Id2 no se asocia a la progresión del CaCu, pues los niveles de expresión del gen sólo se incrementaron moderadamente en HSIL. Concordantemente, la posible participación de Id2 en la diferenciación epitelial (Yokota y Mori, 2002) parece también confirmada por la baja expresión del gen en cultivos primarios de queratinocitos cervicales constituidos mayormente por células basales con escaso grado de diferenciación terminal.

En conclusión, nuestro trabajo muestra que los genes Id1 e Id3 y en menor grado Id2 se sobreexpresan en las células epiteliales del cérvix con HSIL y en las líneas celulares HeLa y SiHa, y que el gen Id3 es sobreexpresado moderadamente en cérvix con LSIL. Estos hallazgos indican que los genes Id pueden emplearse como marcadores de la progresión del CaCu y aseguran la pertinencia de estudios adicionales sobre su desregulación.

REFERENCIAS

- Badal V, Chuang LS, Tan EH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, Li BF, Bernard HU (2003) CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 77:6227-6234
- Baldauf JJ, Ritter J (1998) Comparison of the risks of cytologic surveillance of women with atypical cells of low-grade abnormalities on cervical smear: review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 76:193-199
- Bodner-Adler B, Hefler L, Bodner K, Leodolter S, Frischmuth K, Kainz C, Mayerhofer K (2001) Serum levels of angiogenin (ANG) in invasive cervical cancer and in cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Anticancer Res* 21:809-812
- Burd EM (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 16:1-17
- Chen CL, Liu SS, Ip SM, Wong LC, Ng TY, Ngan HY (2003) E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer* 39:517:523
- Coppe JP, Itahana Y, Moore DH, Bennington JL, Desprez PY (2004) Id1 and Id2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 10:2044-2051
- Damdinsuren B, Nagano H, Kondo M, Yamamoto H, Hiraoka N, Yamamoto T, Marubashi S, Miyamoto A, Umeshita K, Dono K, Nakamori S, Wakasa K, Sakon M, Monden M (2005) Expression of Id proteins in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Int J Oncol* 26:319-327
- de Candia P, Benera R, Solit DB (2004) A role for Id proteins in mammary gland physiology and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 92:81-94
- Desprez PY, Lin CQ, Thomasset N, Sympson CJ, Bissell MJ, Campisi J (1998) A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the helix-loop-helix protein, Id1. *Mol Cell Biol* 18:4577-4588
- Fahey MT, Irwig L, Macaskill P (1995) Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 141:680-689

- Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A (2001) Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 164:1017-1025
- Giuliano AR, Papenfuss M, Abrahamsen M, Denman C, de Zapien JG, Henze JL, Ortega L, Brown de Galaz EM, Stephan J, Feng J, Baldwin S, Garcia F, Hatch K (2001) Human papillomavirus infection at the United States-Mexico border: implications for cervical cancer prevention and control. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1129-1136
- Goodman A, Wilbur DC (2003) Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 32-2003. A 37-year-old woman with atypical squamous cells on a Papanicolaou smear. *N Engl J Med* 349:1555-1564
- Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL (1986) Growth factors and cancer. *Cancer Res* 46:1015-1029
- Gustafsson L, Ponten J, Zack M, Adami HO (1997) International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening. *Cancer Causes Control* 8:755-763
- Herbsleb M, Knudsen UB, Orntoft TF, Bichel P, Norrild B, Knudsen A, Mogensen O (2001) Telomerase activity, MIB-1, PCNA, HPV 16 and p53 as diagnostic markers for cervical intraepithelial neoplasia. *APMIS* 109:607-617
- Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T (1999) Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 91:252-258
- Hu YC, Lam KY, Law S, Wong J, Srivastava G (2001) Profiling of differentially expressed cancer-related genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using human cancer cDNA arrays: overexpression of oncogene MET correlates with tumor differentiation in ESCC. *Clin Cancer Res* 7:3519-3525
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risks to Humans (1996) Vol. 64. "Human Papillomaviruses." Lyon. France: World Health Organization International Agency for Research on Cancer, 1995 Meeting of IARC Working Group on 6-13 June 1995

- INEGI (2001) Principales causas de mortalidad general en mujeres 2001. Estadísticas del sector salud y seguridad social, cuaderno no. 19, edición 2002, pág 51. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, Dirección General de Estadística (www.inegi.gob.mx)
- Israel MA, Hernandez MC, Florio M, Andres-Barquin PJ, Mantani A, Carter JH, Julin CM (1999) Id gene expression as a key mediator of tumor cell biology. *Cancer Res* 59:1726s-1730s
- Itahana Y, Singh J, Sumida T, Coppe JP, Parrinello S, Bennington JL, Desprez PY (2003) Role of Id-2 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in breast cancer cells. *Cancer Res* 63:7098-7105
- Jarboe EA, Liaw KL, Thompson LC, Heinz DE, Baker PL, McGregor JA, Dunn T, Woods JE, Shroyer KR (2002) Analysis of telomerase as a diagnostic biomarker of cervical dysplasia and carcinoma. *Oncogene* 21:664-673
- Kebebew E, Treseler PA, Duh QY, Clark OH (2000) The helix-loop-helix transcription factor, Id1, is overexpressed in medullary thyroid cancer. *Surgery* 128:952-957
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M (2001) Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 92:276-284
- Langlands K, Down GA, Kealey T (2000) Id proteins are dynamically expressed in normal epidermis and dysregulated in squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 60:5929-5933
- Lazcano-Ponce E, Rascon-Pacheco R, Lozano-Ascencio R, Velasco E (1996) Mortality from carcinoma of the uterine cervix in Mexico: Impact of screening 1980-1990. *Acta Cytol* 40:506-512
- Le Jossic C, Ilyin GP, Loyer P, Glaise D, Cariou S, Guguen-Guillouzo C (1994) Expression of helix-loop-helix factor Id-1 is dependent on the hepatocyte proliferation and differentiation status in rat liver and in primary culture. *Cancer Res* 54:6065-6068

- Lin CQ, Singh J, Murata K, Itahana Y, Parrinello S, Liang SH, Gillet CE, Campisi J, Desprez PY (2000) A role for Id1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res* 60:1332-1340
- Ling MT, Lau TC, Zhou C, Chua CW, Kwok WK, Wang Q, Wang X, Wong YC (2005) Overexpression of Id1 in prostate cancer cells promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Carcinogenesis* 26:1668-1676
- Ling MT, Wang X, Ouyang XS, Lee TK, Fan TY, Xu K, Tsao SW, Wong YC (2002) Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth. *Oncogene* 21:8498-8505
- Ling MT, Wang X, Ouyang XS, Xu K, Tsao SW, Wong YC (2003) Id1 expression promotes cell survival through activation of NF-kappaB signalling pathway in prostate cancer cells. *Oncogene* 22:4498-4508
- Maruyama H, Kleeff J, Wildi S, Friess H, Buchler MW, Israel MA, Korc M (1999) Id1 and Id2 are overexpressed in pancreatic cancer and in dysplastic lesions in chronic pancreatitis. *Am J Pathol* 155:815-822
- Mathur SP, Mathur RS, Underwood PB, Kohler MF, Creasman WT (2003) Circulating levels of insulin-like growth factor-II and IGF-binding protein 3 in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 91:486-493
- McCrorry DC, Matchar DB, Bastian L, Datta S, Hasselblad V, Hickey J, Myers E, Nanda K (1999) Evaluation of cervical cytology. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 5:1-6
- Norton JD (2000) Id helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 113:3897-3905
- Oh MJ, Choi JH, Kim IH, Lee YH, Huh JY, Park YK, Lee KW, Chouhg SY, Joo KS, Ku BS, Saw HS (2000) Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of patients with cervical carcinoma. *Clin Cancer Res* 6:4760-4763
- Oridate N, Lotan D, Mitchell MF, Hong WK, Lotan R (1995) Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by retinoids: implications for chemoprevention. *J Cell Biochem (Suppl)* 23:80-86

- Ostör AG (1993) Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 12:186-192
- Ouyang XS, Wang X, Lee DT, Tsao SW, Wong YC (2002a) Overexpression of Id1 in prostate cancer. *J Urol* 167:2598-2602
- Ouyang XS, Wang X, Ling MT, Wong HL, Tsao SW, Wong YC (2002b). Id-1 stimulates serum independent prostate cancer cell proliferation through inactivation of p16(INK4a)/pRB pathway. *Carcinogenesis* 23:721-725
- Polsky D, Young AZ, Busam KJ, Alani RM (2001) The transcriptional repressor of p16/Ink4a, Id1, is up-regulated in early melanomas. *Cancer Res* 61:6008-6011
- Reddy VG, Khanna N, Jain SK, Das BC, Singh N (2001) Telomerase - A molecular marker for cervical cancer screening. *Int J Gynecol Cancer* 11:100-106
- Rheinwald JG, Green H (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-344
- Richart RM, Wright TC Jr (1991) Pathology of the cervix. *Curr Opin Obstet Gynecol* 3:561-567
- Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T (2002) Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol Int* 52:375-383
- Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P (2002) Overexpression of p16INK4A in liquid-based specimens (SurePath) as a marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 27:365-370
- Schiffman M, Wheeler CM, Castle PE, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study Group (2002) Human papillomavirus DNA remains detectable longer than related cervical cytologic abnormalities. *J Infect Dis* 186:1169-1172
- Schindl M, Oberhuber G, Obermair A, Schoppmann SF, Karner B, Birner P (2001) Overexpression of Id1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer. *Cancer Res* 61:5703-5706

- Schindl M, Schoppmann SF, Strobel T, Heinzl H, Leisser C, Horvat R, Birner P (2003) Level of Id1 protein expression correlates with poor differentiation, enhanced malignant potential, and more aggressive clinical behavior of epithelial ovarian tumors. *Clin Cancer Res* 9:779-785
- Schoppmann SF, Schindl M, Bayer G, Aumayr K, Dienes J, Horvat R, Rudas M, Gnant M, Jakesz R, Birner P (2003) Overexpression of Id1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer. *Int J Cancer* 104:677-682
- Secretaría de Salud (2004) <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/index.html#>
- Sen S, Reddy VG, Guleria R, Jain SK, Kapila K, Singh N (2002) Telomerase-a potential molecular marker of lung and cervical cancer. *Clin Chem Lab Med* 40:994-1001
- Sikder HA, Devlin MK, Dunlap S, Ryu B, Alani RM (2003) Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 3:525-530
- Singh J, Murata K, Itahana Y, Desprez PY (2002) Constitutive expression of the Id-1 promoter in human metastatic breast cancer cells is linked with the loss of NF-1/Rb/HDAC-1 transcription repressor complex. *Oncogene* 21:1812-1822
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287:2114-2119
- Sopov I, Sorensen T, Magbagbeolu M, Jansen L, Beer K, Kuhne-Heid R, Kirchmayr R, Schneider A, Durst M (2004) Detection of cancer-related gene expression profiles in severe cervical neoplasia. *Int J Cancer* 112:33-43
- Stanley MA (2002) Culture of human cervical epithelial cells. En: Freshney RI, Freshney MG (eds). *Culture of epithelial cells*, 2a ed, Wiley-Liss, NY, pp 137-169
- Strait KA, Dabbas B, Hammond EH, Warnick C, Tlstrup SJ, Ford CD (2002) Cell cycle blockade and differentiation of ovarian cancer cells by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A are associated with changes in p21, Rb, and Id proteins. *Mol Cancer Ther* 1:1181-1190

- Su PF, Wu FY (1996) Differential suppression of the tumorigenicity of HeLa and SiHa cells by adeno-associated virus. *Br J Cancer* 73:1533-1537
- Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Miyakawa I (2001) Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 165:185-193
- Trausch-Azar JS, Lingbeck J, Ciechanover A, Schwartz AL (2004) Ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Id1 is modulated by MyoD. *J Biol Chem* 279:32614-32619
- Unger ER, Steinau M, Rajeevan MS, Swan D, Lee DR, Vernon SD (2004) Molecular markers for early detection of cervical neoplasia. *Dis Markers* 20:103-116
- Vandeputte DA, Troost D, Leenstra S, Ijlst-Keizers H, Ramkema M, Bosch DA, Baas F, Das NK, Aronica E (2002) Expression and distribution of Id helix-loop-helix proteins in human astrocytic tumors. *Glia* 38:329-338
- Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zoechbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar AF (2001) Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 7:584-589
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Sha KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 180:12-19
- Wang X, Xu K, Ling MT, Wong YC, Feng HC, Nicholls J, Tsao SW (2002) Evidence of increased Id-1 expression and its role in cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Mol Carcinog* 35:42-49
- Wilson JW, Deed RW, Inoue T, Balzi M, Becciolini A, Faraoni P, Potten CS, Norton JD (2001) Expression of Id helix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index. *Cancer Res* 61:8803-8810
- Wisman GB, De Jong S, Meersma GJ, Helder MN, Hollema H, de Vries EG, Keith WN, van der Zee AG (2000) Telomerase in (pre)neoplastic cervical disease. *Hum Pathol* 31:1304-1312

Yokota Y, Mori S (2002) Role of Id family proteins in growth control. *J Cell Physiol* 190:21-28

Zhang X, Ling MT, Feng H, Wong YC, Tsao SW, Wang X (2004) Id1 stimulates cell proliferation through activation of EGFR in ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 91:2042-2047

zur Hausen H (1977) Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol* 78:1-8

zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-350

Tabla 1. Marcadores moleculares asociados al CaCu

Tipo	Marcador	Lesión	Referencia
Sérico	EGFR	HSIL, CaCu	Oh y cols, 2000
	ANG	CaCu	Bodner-Adler y cols, 2001
	IGF-II	CaCu	Mathur y cols, 2003
Tisular	Telomerasa	LSIL, HSIL, CaCu	Herbsleb y cols, 2001 Reddy y cols, 2001 Sen y cols, 2002 Wisman y cols, 2000
	p16INK4A	LSIL, HSIL, CaCu	Sano y cols, 2002 Saqi y cols, 2002 Klaes y cols, 2001
	Metilación DNA	HSIL, CaCu	Badal y cols, 2003 Chen y cols, 2003 Virmani y cols, 2001

EGFR, receptor para el factor de crecimiento epidérmico; ANG, angiogenina; IGF-II, factor de crecimiento similar a insulina tipo II.

Tabla 2. Sobreexpresión de los genes Id en cánceres humanos

Tipo de Cáncer	Id sobreexpresado	Referencia
Mama	Id1	Lin y cols, 2000; Schooppmann y cols, 2003
Ovario	Id1	Schindl y cols, 2003
Próstata	Id1	Ouyang y cols, 2002a,b
Tiroides	Id1	Kebebew y cols, 2000
Endometrio	Id1	Takai y cols, 2001
Carcinomas de células escamosas del esófago	Id1	Hu y cols, 2001
Carcinoma de células escamosas de nasofaringe	Id1	Wang y cols, 2002
Melanoma	Id1	Polsky y cols, 2001
Páncreas	Id1, Id2, Id3	Maruyama y cols, 1999
Colorrectal	Id1, Id2, Id3	Wilson y cols, 2001
Tumores astrocíticos	Id1, Id2, Id3	Vandeputte y cols, 2002
Carcinomas de células escamosas del cuello y la cabeza	Id1, Id2, Id3	Langlands y cols, 2000

PIES DE FIGURAS

Figura 1. Histología del epitelio cervicouterino. Este epitelio consta de cuatro estratos celulares. El estrato basal está compuesto por una monocapa de células esféricas, proliferativas y núcleos relativamente grandes. El estrato parabasal está compuesto por células poliédricas, posmitóticas y núcleos prominentes. El estrato intermedio está compuesto por varias capas de células ligeramente aplanadas, citoplasma rico en glucógeno, vacuolación frecuente y núcleos relativamente pequeños. El estrato superficial compuesto por varias capas de células aplanadas, grandes de forma poligonal y con núcleos pequeños, varía en espesor con el estado de los estrógenos. Este último estrato representa el estadio final de diferenciación y maduración del epitelio.

Figura 2. Ciclo de replicación del virus del papiloma humano. El ciclo de replicación del VPH está ligado al programa de diferenciación de la célula hospedera, con producción de partículas virales restringida a las células parabasales. La infección requiere la disponibilidad del estrato basal y ocurre usualmente cuando se presentan microlesiones en el epitelio. Las células infectadas se dividen y la población se expande lateralmente. Algunas células de la progenie migran al estrato suprabasal e inician su diferenciación terminal. En este estrato los genes virales E6 y E7 son activados, el DNA viral es replicado y se sintetizan las proteínas L1 y L2 de la cápside viral. Las partículas son ensambladas en el estrato superficial y liberadas en la superficie, y pueden originar infecciones adicionales.

Figura 3. Progresión del CaCu. La integración del DNA de VPH es fundamental para el proceso de carcinogénesis. En esta condición no se producen partículas virales y no hay lisis celular; el DNA viral interactúa con oncogenes de la célula huésped estimulando genes que activan la proliferación celular e inhibiendo genes que suprimen la proliferación. Histológicamente se manifiesta como lesiones intraepiteliales escamosas;

al ir aumentando la severidad de las lesiones, disminuye el proceso de diferenciación celular.

Figura 4. Efectos de los factores Id sobre la transcripción. El

heterodímero bHLH-bHLH se une al DNA y activa la transcripción de genes asociados a diferenciación. El heterodímero bHLH-Id es incapaz de unirse al DNA e inhibe la transcripción de genes asociados a diferenciación.

Figura 5. Cinética de amplificación de los mRNAs para b-actina, Id1, Id2 e Id3 en biopsias de cérvix normal o con LSIL y en células HeLa. El RNA total de

una biopsia de cérvix normal (○), una con LSIL (▽) y de un cultivo de células HeLa (□) se aisló con Trizol[®]. Los cDNAs se generaron mediante transcripción reversa y se amplificaron por PCR durante los ciclos señalados en cada caso. Los productos de amplificación se cuantificaron en pixeles.

Figura 6. Transcritos de Id1, Id2 e Id3 en biopsias de cérvix normal y en las líneas celulares HeLa y SiHa derivadas de cáncer cervicouterino. El RNA total

de ocho biopsias de cérvix normal y de cultivos de las líneas celulares HeLa y SiHa por duplicado se extrajo con Trizol[®]. Los cDNAs de Id1, Id2 e Id3 se generaron mediante transcripción reversa y se amplificaron por PCR empleando oligonucleótidos específicos durante 23, 24 y 24 ciclos, respectivamente. Los productos de amplificación se cuantificaron en pixeles usando como control el producto de β -actina.

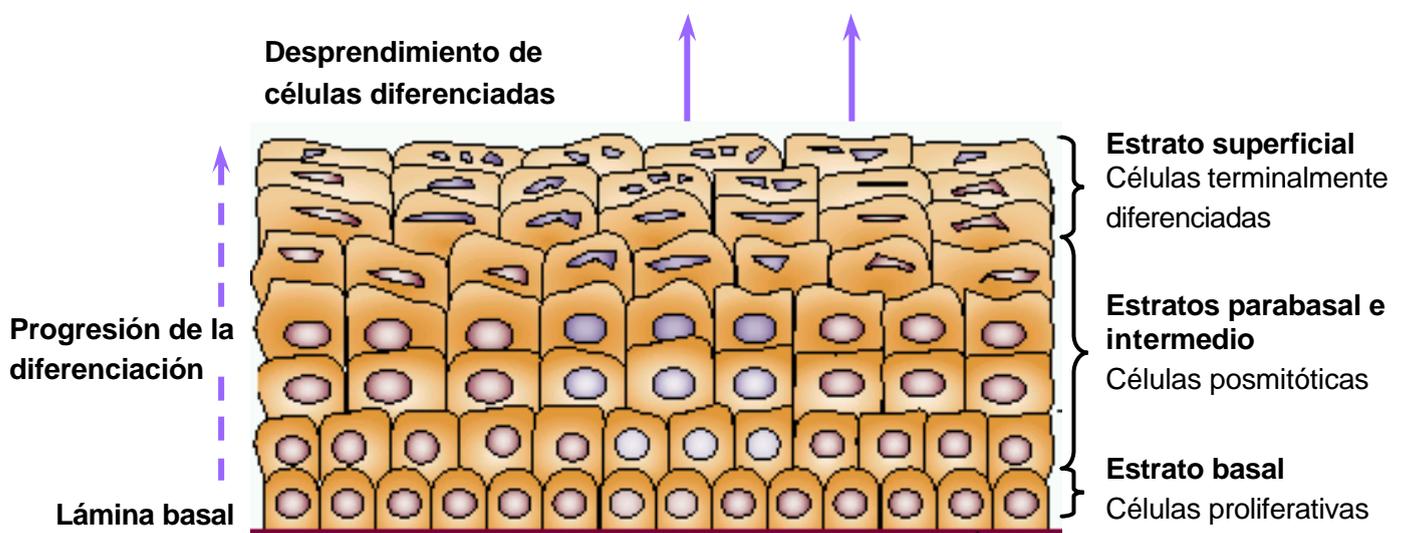
Figura 7. Transcritos de Id1, Id2 e Id3 en biopsias de cérvix normal, con LSIL o con HSIL. El RNA total de ocho biopsias de cérvix normal, 12 con LSIL y 13 con

HSIL se extrajo con Trizol[®]. Los cDNAs de Id1, Id2 e Id3 se generaron mediante transcripción reversa y se amplificaron por PCR empleando oligonucleótidos específicos durante 23, 24 y 24 ciclos, respectivamente. Los productos de amplificación del mRNA de Id1, Id2 e Id3 se cuantificaron en pixeles usando como control el producto de β -actina.

Figura 8. Cultivos primarios de queratinocitos derivados de biopsias del cérvix con LSIL. La fracción epitelial de biopsias de cérvix con LSIL se dividió en fragmentos pequeños que se incubaron con tripsina al 0.25%. La suspensión de queratinocitos se sembró sobre una monocapa de células alimentadoras 3T3-J. El crecimiento celular fue monitoreado diariamente. A los 6 días de cultivo los queratinocitos de forma poligonal comienzan a crecer en colonias y progresivamente desplazaron a las células alimentadoras (A y B). Las colonias de queratinocitos continuaron expandiéndose y los del centro de la colonia comenzaron a diferenciarse; hubo mayor desplazamiento de las células alimentadoras a los 10 días de cultivo (C y D). A los 14 días de cultivo había una combinación de queratinocitos pequeños y con alto grado de diferenciación (E y F). (Flecha continua blanca: queratinocitos basales, flecha punteada blanca: células diferenciadas, flecha negra: células alimentadoras).

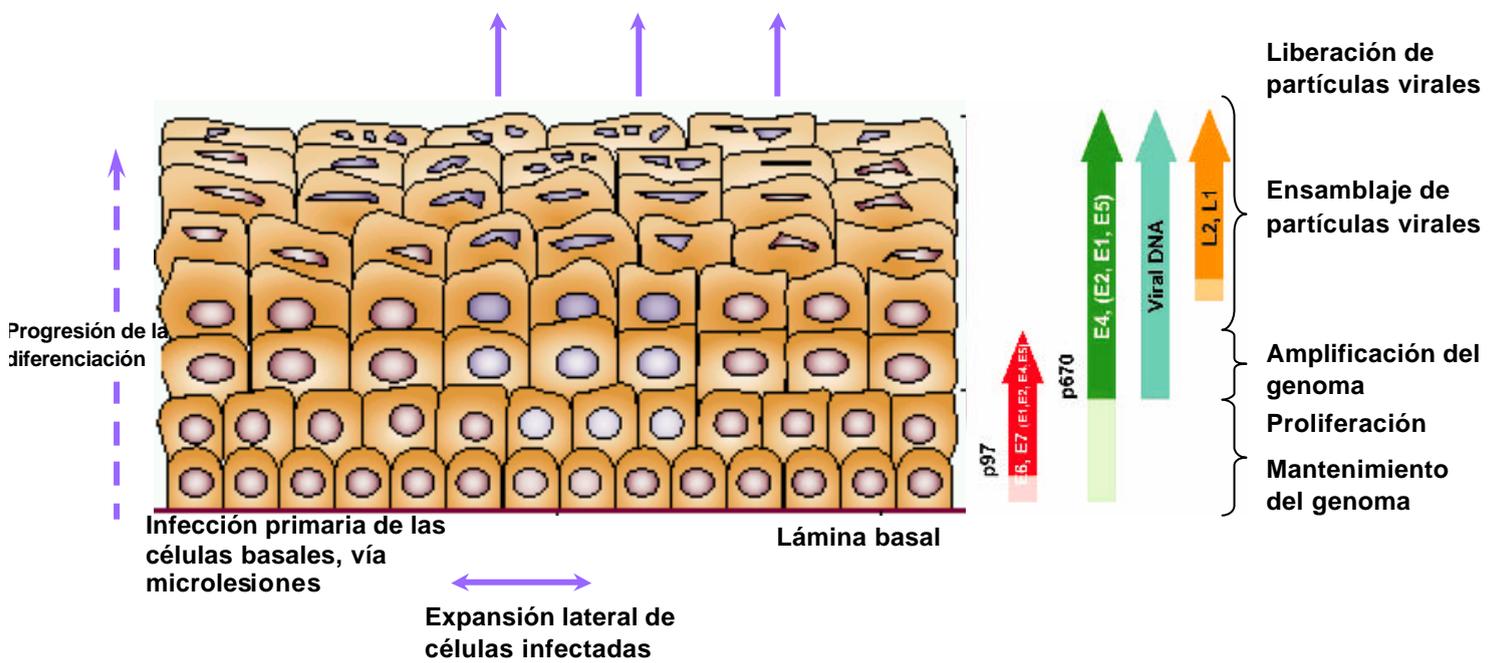
Figura 9. Transcritos de Id1, Id2 e Id3 en cérvix normal o con LSIL y en cultivos primarios derivados de biopsias con LSIL. El RNA total de ocho biopsias de cérvix normal, 12 con LSIL y de cuatro cultivos celulares de LSIL se extrajo con Trizol[®]. Los cDNAs de Id1, Id2 e Id3 se generaron mediante transcripción reversa y se amplificaron por PCR empleando oligonucleótidos específicos durante 23, 24 y 24 ciclos, respectivamente. Los productos de amplificación se cuantificaron en pixeles usando como control el producto de β -actina.

Figura 10. Expresión de los genes Id1, Id2, Id3 y b-actina en células 3T3-J, tratadas y sin tratar con mitomicina-C. Electroforesis en agarosa 2% de la RT-PCR de distintas muestras de los productos de β -actina, Id1, Id2 e Id3. Carriles 1 y 2, células 3T3-J; carriles 3 y 4, células 3T3-J mitomicinadas; carriles 5 y 6, remanentes de células 3T3-J mitomicinadas; carril 7, control positivo (cérvix normal); carril 8, control negativo (agua).



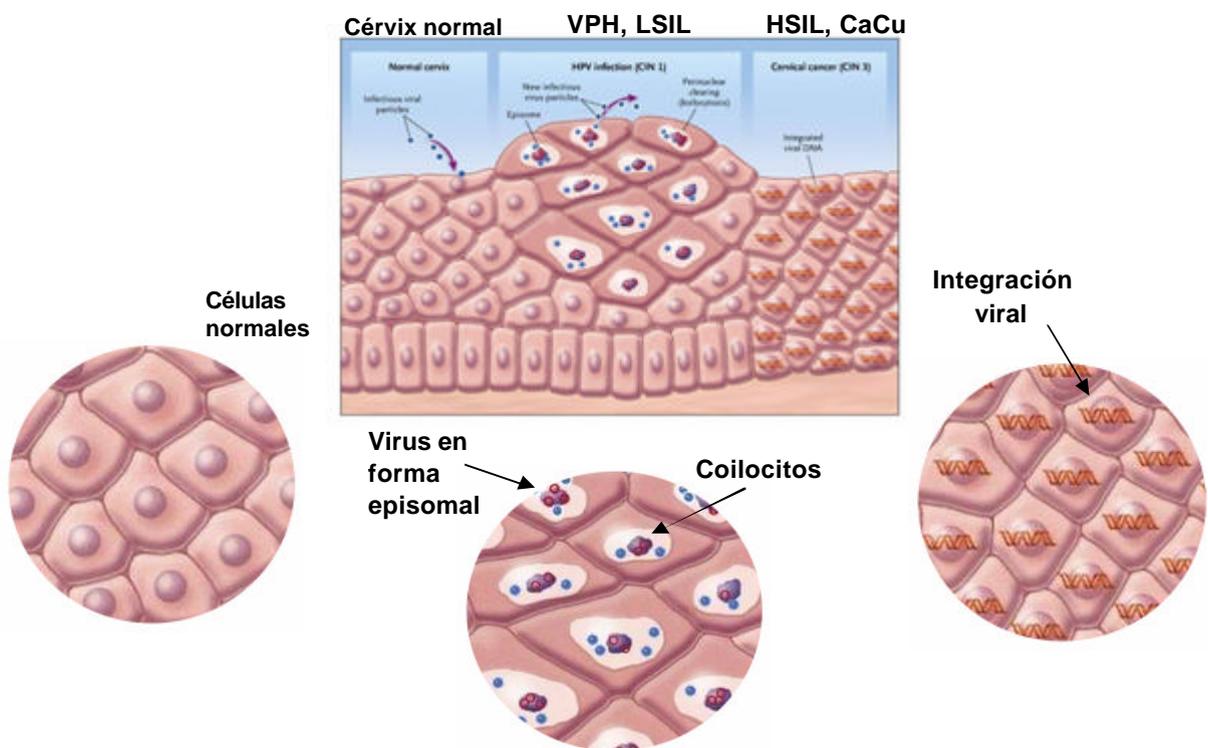
Modificado de zur Hausen, 2002

Figura 1. Histología del epitelio cervicouterino



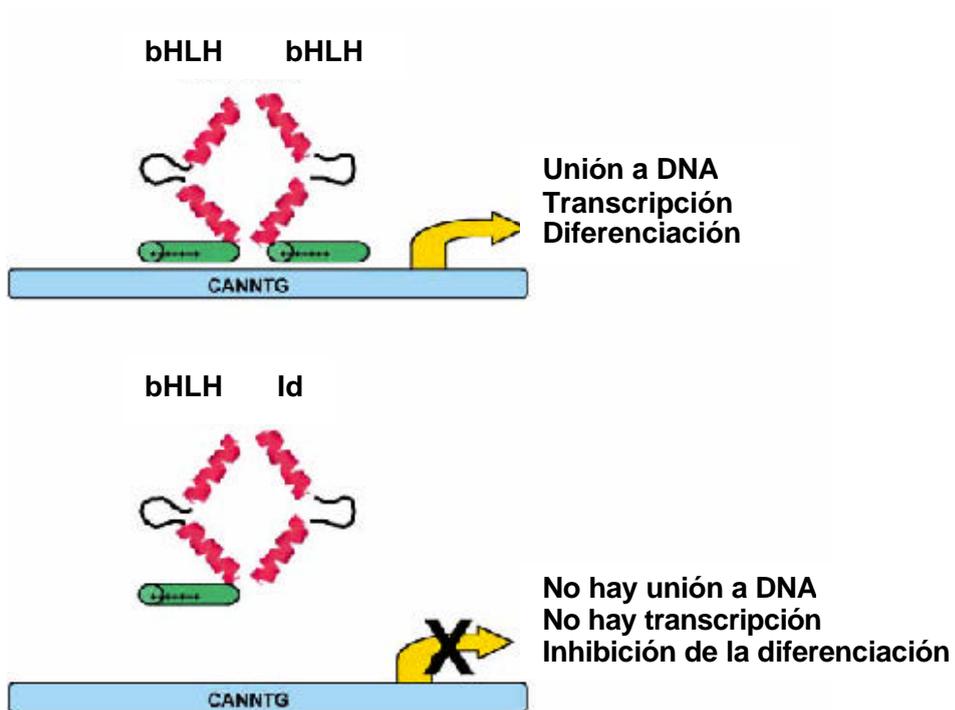
Modificado de zur Hausen, 2002

Figura 2. Ciclo de replicación del virus del papiloma humano



Modificado de Goodman y Wilbur, 2003

Figura 3. Progresión del CaCu



Sikder y cols, 2003

Figura 4. Efectos de los factores Id sobre la transcripción

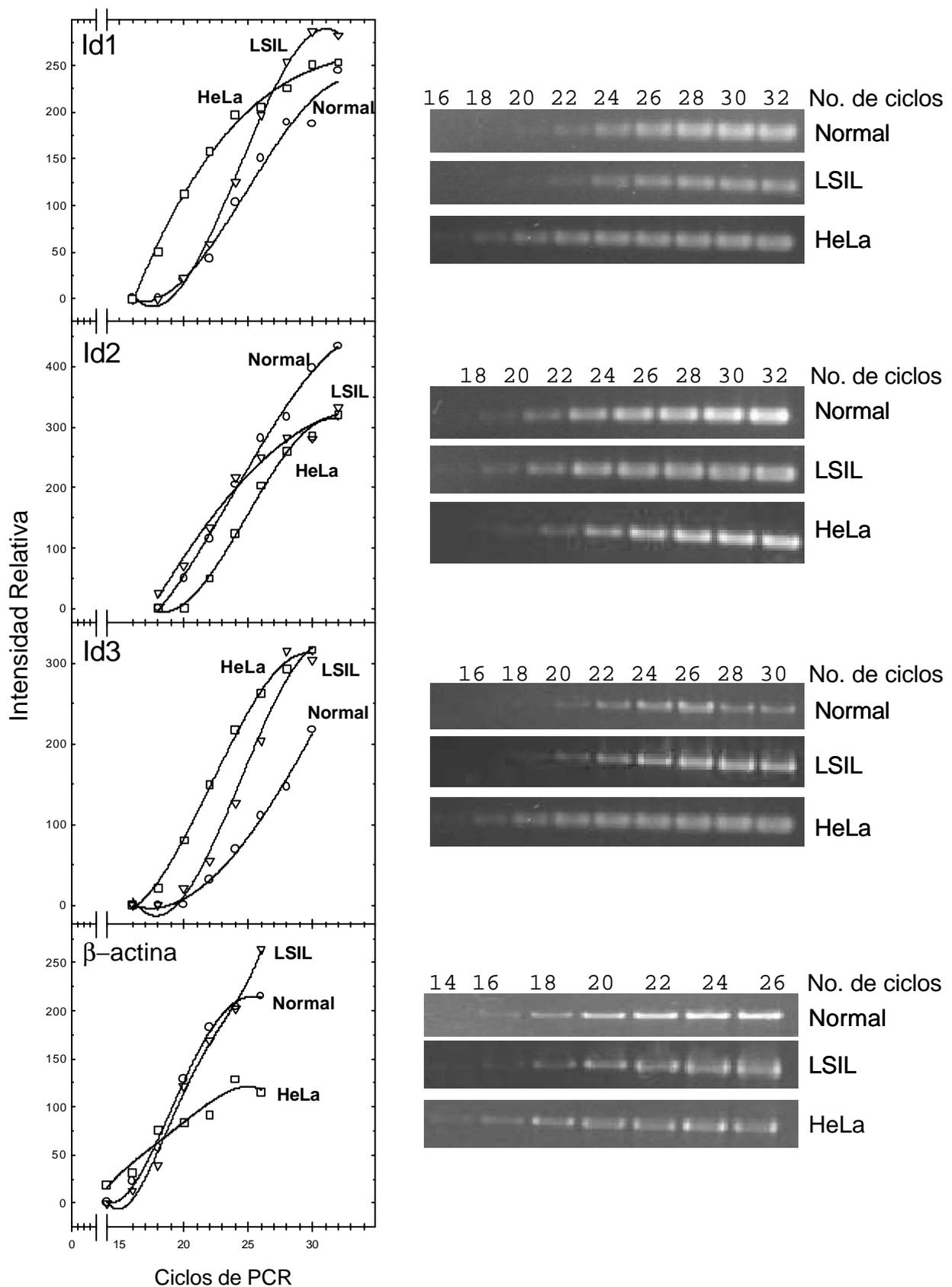


Figura 5. Cinética de amplificación de los mRNAs para b-actina, Id1, Id2 e Id3 en biopsias de cérvix normal o con LSIL y en células HeLa

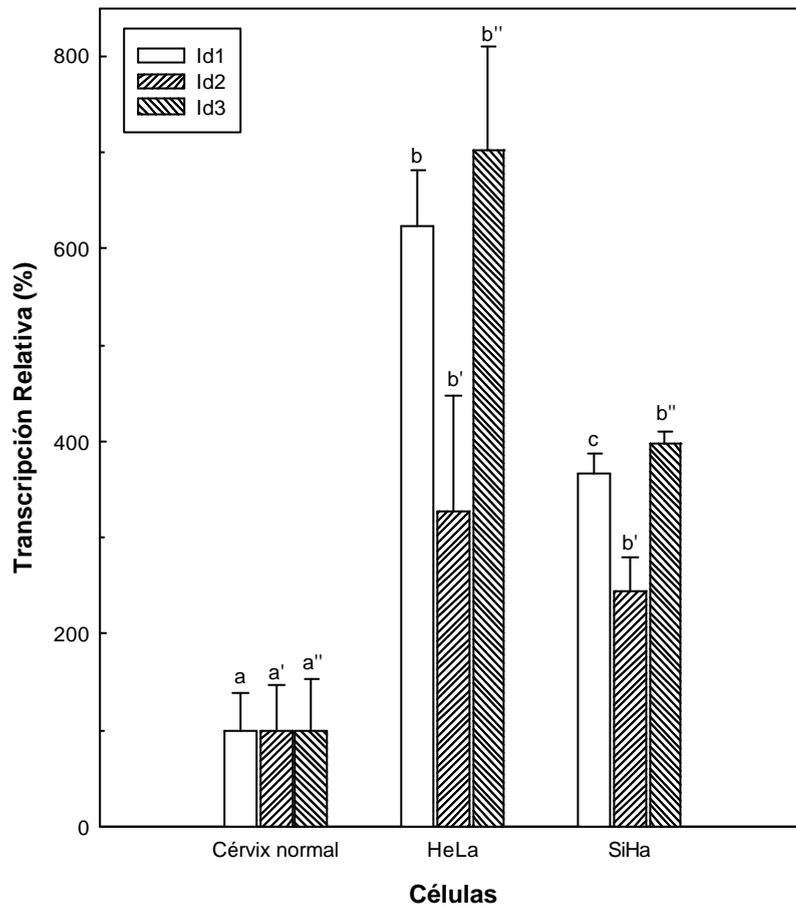
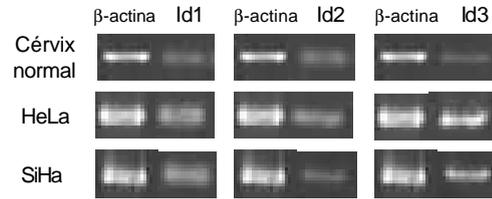


Figura 6. Transcritos de Id1, Id2 e Id3 en biopsias de cérvix normal y en las líneas celulares HeLa y SiHa derivadas de cáncer cervicouterino

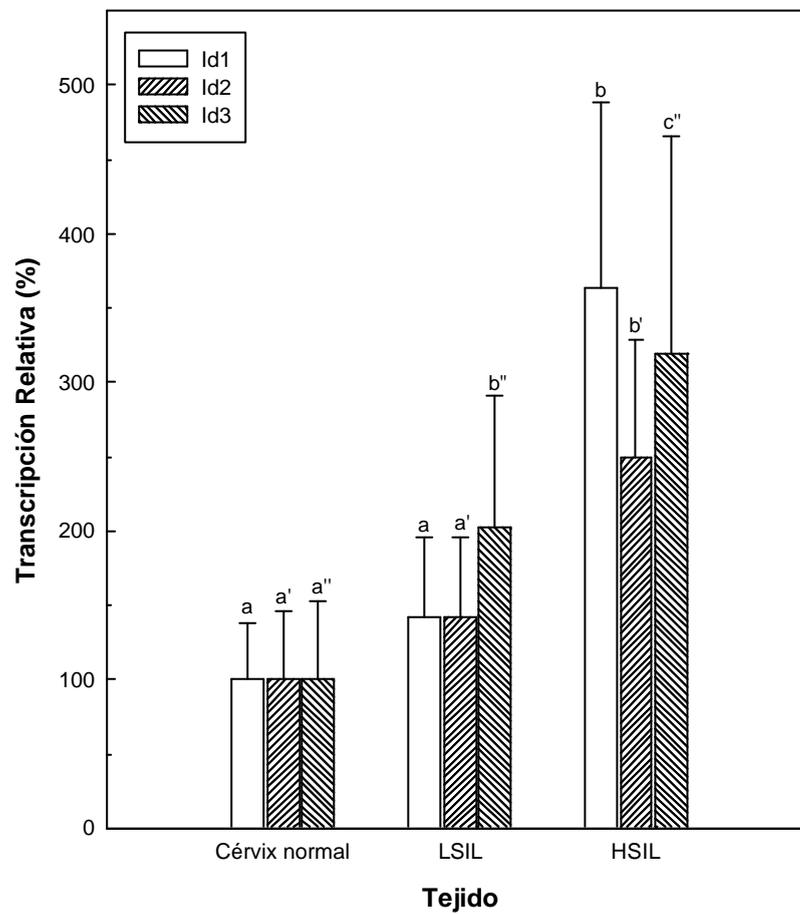
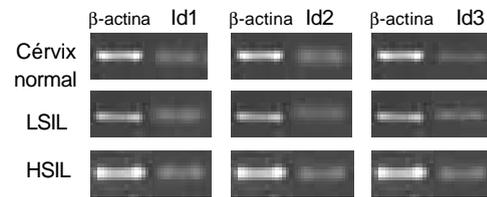
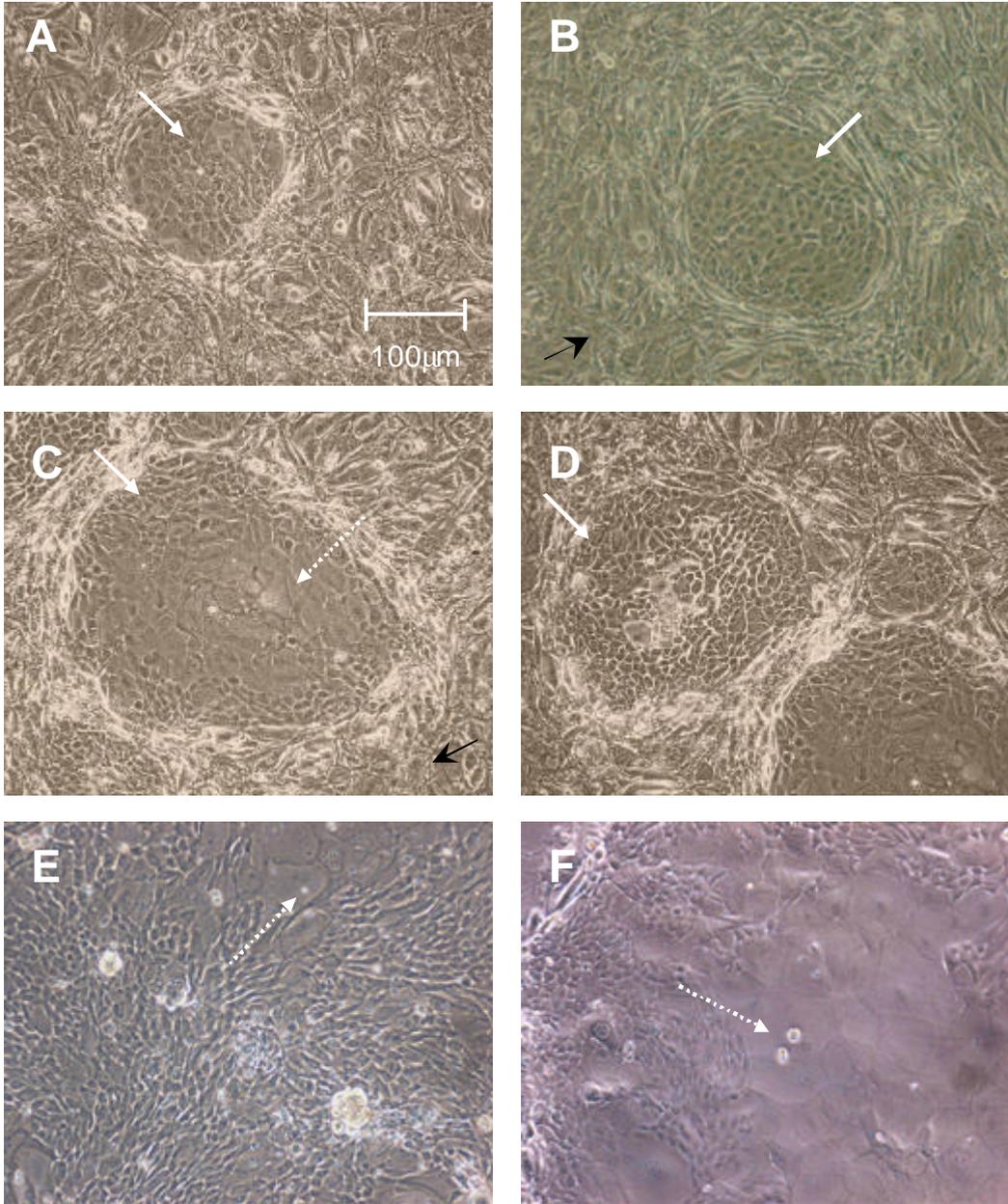


Figura 7. Transcritos de Id1, Id2 e Id3 en biopsias de cérvix normal, con LSIL o con HSIL



**Figura 8. Cultivos primarios de queratinocitos derivados de biopsias del
cérnix con LSIL**

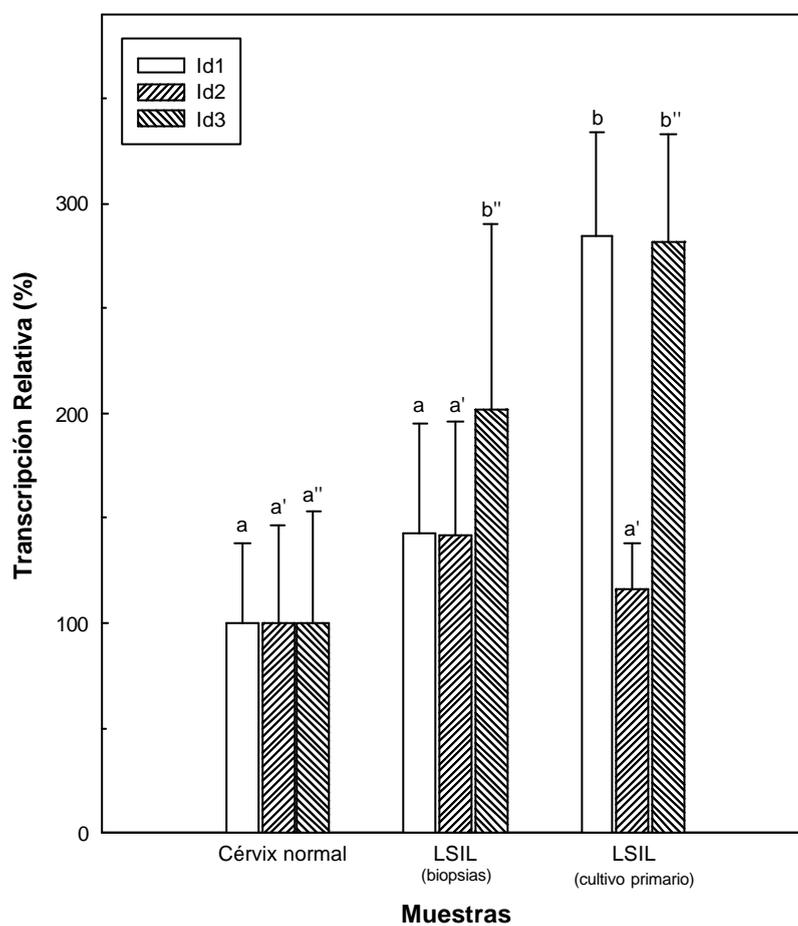
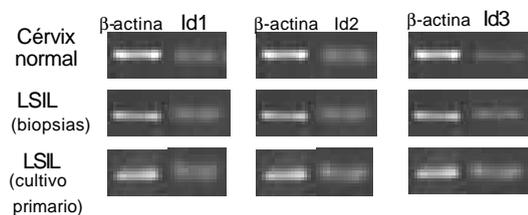


Figura 9. Transcritos de Id1, Id2 e Id3 en cérvix normal o con LSIL y en cultivos primarios derivados de biopsias con LSIL

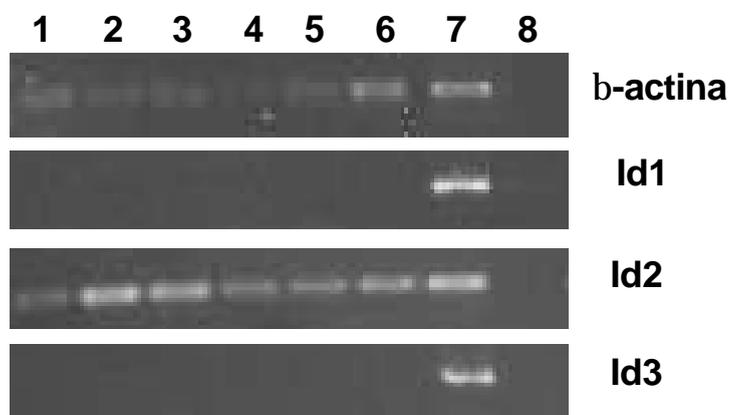


Figura 10. Expresión de los genes Id1, Id2, Id3 y b-actina en células 3T3-J, tratadas y sin tratar con mitomicina-C